



# Obtención de biocompuestos para regeneración de tejido óseo

L. Medina

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-UNLP), La Plata, Argentina.

medinalara@inifta.unlp.edu.ar

Director: M. S. Cortizo

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-UNLP), La Plata, Argentina.

Grupo Colaborador: M. S. Belluzo

Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA-UNLP), La Plata, Argentina

## Resumen

En la actualidad, la ingeniería de tejidos ha puesto principal atención en la obtención de materiales porosos biodegradables capaces de inducir la formación o reparación de nuevo tejido. En particular, en el caso de la regeneración ósea, estos materiales pueden combinar componentes constitutivos del hueso (tales como hidroxiapatita-HA) con polímeros naturales no citotóxicos y biodegradables. Tanto la estructura como las propiedades mecánicas de estos materiales deben ser adecuadas para permitir la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Así, una vez implantando en el sitio de la lesión, estos biomateriales deben promover y guiar la reparación ósea con una cinética acorde a su velocidad de degradación.

El objetivo de este trabajo fue obtener compuestos biodegradables combinando nano HA con complejos polielectrolíticos formados por quitosano (Qo – polielectrolito catiónico) y carboximetilcelulosa (CMC – polielectrolito aniónico).

Los biocompuestos se prepararon a partir de una solución de Qo 1% p/v en ácido acético 0,25% p/v y una solución acuosa de CMC 1% p/v. La hidroxiapatita de dimensiones nanométricas fue obtenida en nuestro laboratorio. Los biocompuestos se obtuvieron por goteo de la solución de CMC sobre la mezcla Qo – HA (previamente homogeneizada) en presencia de ultrasonido y con agitación constante. Finalmente, los biocompuestos se liofilizaron hasta peso constante.

Para evaluar morfológicamente las matrices Qo- CMC -HA, se realizó una microscopía electrónica de barrido (SEM), en la que se pudo apreciar la formación de una estructura porosa, con un tamaño de poro apropiado para el crecimiento celular. Se evaluaron las interacciones entre los componentes Qo- CMC -HA mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR), evidenciando un tipo de unión característica entre ellos debido a la aplicación de ultrasonido. Finalmente, se evaluó el comportamiento hidrogel de estos compuestos mediante estudios de hinchamiento y de estabilidad.

Los resultados obtenidos muestran que estos biocompuestos resultan promisorios como soporte para la regeneración de tejido óseo.

**Palabras clave:** biocompuestos, nano HA, quitosano, carboximetilcelulosa

**Keywords:** biocomposites, nano HA, chitosan, carboxymethylcellulose

## 1. Introducción

En el área biomédica, y en particular en ingeniería de tejido óseo, se ha puesto principal atención a la obtención de materiales porosos biodegradables para inducir la formación de hueso usándolo como un soporte o “scaffold” para el crecimiento celular, con algunas ventajas sobre otras técnicas como autoinjerto y aloinjerto [1]. Es importante lograr un material cuya porosidad, resistencia mecánica, y características topológicas sean propicias para el desarrollo de las células. Además, estos materiales pueden combinar algún componente constitutivo del hueso (tal como la hidroxiapatita) con polímeros biodegradables, naturales, no tóxicos para mejorar las propiedades de los materiales obtenidos. Actualmente, compuestos basados en hidroxiapatita a nanoescala (HA) y polímeros orgánicos han sido ampliamente utilizados para este propósito.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es obtener un nuevo material compuesto degradable que combine

nano-HA con un complejo polielectrolito basado en dos polímeros naturales: quitosano (Qo - polielectrolito catiónico) y carboximetilcelulosa (CMC - polielectrolito aniónico), empleando ultrasonido (US) para su compatibilización.

## 2. Metodología

### 2.1 Preparación de las matrices

Las matrices se obtuvieron a partir de soluciones 1% p/v de Qo en 0,25% p/v de ácido acético y 1% p/v CMC en agua; la nano-HA utilizada se obtuvo por un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio [2]. Las matrices se obtuvieron por goteo a velocidad controlada de la solución de CMC sobre la solución de Qo-HA, previamente homogeneizada, bajo agitación constante y en presencia de ultrasonido. Finalmente, el biomaterial se depositó sobre platos de cultivo y se liofilizó hasta alcanzar peso constante, generando así las matrices para su posterior estudio.

## 2.2 Caracterización de los biomateriales

La estructura de la matriz se analizó por microscopía de fluorescencia (FM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Las interacciones entre los componentes del material compuesto se estudiaron mediante FTIR-ATR. Finalmente, el comportamiento hidrogel de la matriz se determinó mediante pruebas de hinchamiento y, a fin de valorar la estabilidad de los compuestos, se realizaron pruebas de degradación. Las mismas consistieron en colocar matrices de un tamaño definido en una solución de buffer fosfato (PBS) pH 7,4 a 37°C durante 7 días. Luego de ese período las matrices fueron secadas hasta peso constante, y se calculó la pérdida porcentual de masa.

## 2.3 Pruebas de hinchamiento

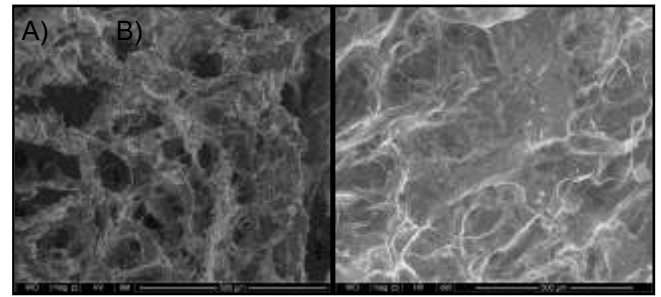
Cinco piezas de las matrices preparadas con un peso seco conocido ( $P_0$ ), de tamaño igual y definido, fueron sumergidas en una solución de PBS pH 7,4 a 37 °C, por un período de tiempo tal que les permitiera alcanzar el equilibrio. Las muestras hinchadas fueron retiradas de la solución, el exceso de agua eliminada con papel absorbente y luego pesadas ( $P_f$ ). El porcentaje de hinchamiento o swelling" (%S) se evaluó mediante el uso de la ecuación. (1):

$$\%S = \frac{P_f - P_0}{P_0} \times 100 \quad (1)$$

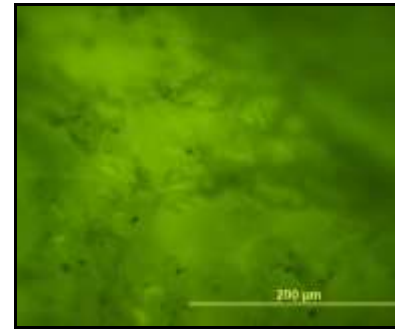
## 3. Resultados y Discusión

Las imágenes de la morfología de las matrices obtenidas por SEM (Fig. 1A y 1B) mostraron una estructura porosa tridimensional para la matriz Qo-CMC-HA, con un tamaño medio de poro entre 200-800µm, adecuado para su posterior aplicación en estudios de proliferación celular.

Similares observaciones se alcanzaron mediante el análisis por FM (Fig. 2).

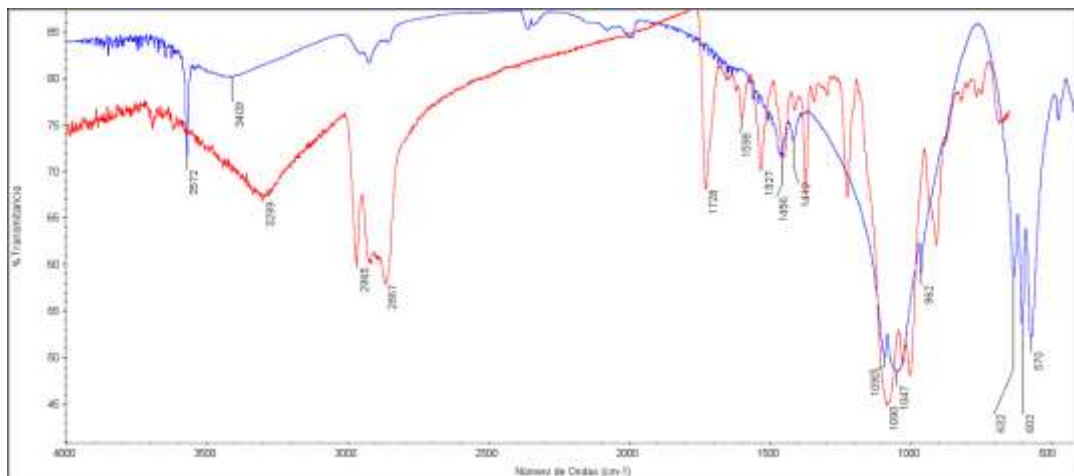


**Figura 1.** Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las matrices Qo-CMC-HA de la A) sección transversal y B) la superficie del biocompuesto.



**Figura 2.** Microscopía de Fluorescencia (FM) de las matrices Qo-CMC-HA.

La Figura 3 muestra los espectros FTIR de las matrices Qo-CMC-HA (en rojo), y de la HA (en azul). En el espectro del "scaffold" a 3299  $\text{cm}^{-1}$  se puede observar la característica banda correspondiente a la vibración de estiramiento del enlace O-H de los grupos OH presentes en el biomaterial. Además, el espectro muestra dos bandas importantes, una relacionada con un grupo éster (1728  $\text{cm}^{-1}$ ), no presente en los polisacáridos de partida y otra banda asociada con un grupo amida (1598  $\text{cm}^{-1}$ ). En el espectro de la HA, las bandas a 3572, 3409 y 632  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los grupos OH estructurales (libres y asociados) en la HA. La banda a 1090  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de un grupo  $\text{PO}_4^{-3}$ , indicada en ambos espectros [3].



**Figura 3.** Espectro FTIR de la HA (Azul), y de las matrices Qo-CMC-HA (Rojo).

Estas observaciones sugieren que el Qo y la CMC se encuentran unidos covalentemente por un enlace éster en el "scaffold" Qo-CMC-HA que podría generarse como consecuencia de la aplicación de US durante la preparación de las matrices. Nuestra propuesta se basa en la formación de un grupo funcional éster por reacción de un ácido carboxílico (de la CMC) y algún grupo funcional hidroxilo (de cualquiera de los polisacáridos presentes) por acción del ultrasonido. Desde hace algunos años se conoce que muchas reacciones de la química orgánica se ven facilitadas por la acción del ultrasonido [4,5]. Entre ellas se puede mencionar las investigaciones realizadas vía sonoquímica con el objetivo de mejorar los rendimientos en reacciones de esterificación a temperatura ambiente y cortos tiempos de reacción [6].

Finalmente, los estudios de hinchamiento revelaron un %S = 1288%, lo que demuestra el comportamiento de hidrogel característico de este tipo de matrices. Las pruebas de degradación a 7 días mostraron una pérdida en el peso de las matrices de  $27,59 \pm 2,27\%$ .

#### 4. Conclusiones

Los resultados de FM y de SEM mostraron una estructura porosa tridimensional para los materiales compuestos Qo-CMC-HA incluyendo HA de dimensiones nanométricas. El tamaño medio de poro fue adecuado para la proliferación celular. El análisis mediante FTIR-ATR mostró interacciones específicas entre los componentes en el biocompuesto y la presencia de la HA en la estructura final. Asimismo se ha demostrado mediante los estudios de hinchamiento que el biomaterial desarrollado exhibe el comportamiento característico de un hidrogel.

Con estos resultados obtenidos se demuestra que estas matrices se comportan como hidrogeles cuya estructura tridimensional, porosidad y estabilidad las hacen biomateriales candidatos para la regeneración de tejidos óseo. Se planea la evaluación de las propiedades mecánicas de las matrices, con el objetivo de verificar su aplicación en regeneración ósea.

#### Agradecimientos

L. Medina agradece a CONICET por su beca doctoral. Este trabajo ha sido parcialmente subsidiado por UNLP (11/X644).

#### Referencias

- [1] L. Jiang, Y.Li, Zhang L., X. Wang. *Materials Science and Engineering C* **29** (2009), 193-198.
- [2] J.M. Fernandez., M.S. Molinuevo, M.S.Cortizo, A.M. Cortizo. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **5(6)** (2011), 126-135.
- [3] R. M. Silverstein, G.C. Bassler, T.C. Morrill *Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos*. Ed. Diana, Mexico (1981).
- [4] R. Miethchen. *Ultrasonics* **30** (1992), 173-179.
- [5] N. Kardos, J.L. Luche. *Carbohydrate Research* **332** (2001), 115-131.

- [6] C. B. Hobuss, D. Venzke, B. S. Pacheco, A. O. Souza, M. A. Z. Santos S. Moura, F.H. Quina, K. G. Fiametti, J.V. Oliveira, C.M.P. Pereira. *Ultrasonics Sonochemistry* **19** (2012), 387-389